

Ocena
pracy doktorskiej mgr Moniki Krzyżostan pt. „Opracowanie nowej linii
dermokosmetyków naturalnych i biodegradowalnych zgodnych z zasadami
zrównoważonego rozwoju oraz wymaganiami Ecocert/COSMOS, przyjaznych
środowisku i skórze”

Celem pracy doktorskiej o charakterze badawczo-wdrożeniowym mgr Moniki Krzyżostan było opracowanie technologii wytwarzania pięciu produktów kosmetycznych o działaniu dermatologicznym: kremu do twarzy, kremu do rąk, balsamu do ciała, emulsji do mycia oraz olejku do demakijażu zawierających substancje aktywne w ekstrakcie i biofermencie z ziela wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica* L). Otrzymane kosmetyki są dedykowane nie tylko do pielęgnowania skóry, ale również do leczenia chorób skóry, głównie atopowego zapalenia skóry.

Tak postawiony cel pracy uznaję za w pełni uzasadniony z trzech powodów. Po pierwsze planowane do otrzymania kosmetyki dermatologiczne oparte są na bazie naturalnych substancji bioaktywnych, a więc są naturalnymi kosmetykami, takimi, jakich poszukują konsumenci. Po drugie mają leczniczy wpływ na uciążliwe, długotrwałe choroby skóry takie jak: atopowe zapalenie, trądzik, łuszczyca i bielactwo. Po trzecie planowane do wytwarzania technologie w założeniach miałyby spełniać standardy technologii dla kosmetyków (COSMOS), a więc powinny być oparte na surowcach łatwo biodegradowalnych otrzymywanych w procesach biorafinacji produktów ubocznych przemysłu spożywczego oraz powinny być energooszczędne, a więc powinny spełniać wymogi zrównoważonego rozwoju, z małym śladem węglowym w środowisku.

Pracę doktorską mgr Moniki Krzyżostan stanowią 3 oryginalne prace twórcze zawierające wyniki przeprowadzonych badań oraz 2 publikacje przeglądowe. Zawartość tych publikacji zaprezentowana jest w opracowaniu przybliżającym tematykę pracy doktorskiej i osiągnięcia przeprowadzonych badań.

W części literaturowej tego opracowania Autorka przybliży tematykę swoich badań i ich cechy charakterystyczne. Omawia zagadnienia zrównoważonego rozwoju przemysłu

kosmetycznego, a więc jego wymogi i uwarunkowania prowadzenia procesów technologicznych. Głównymi wymogami prowadzenia technologii kosmetyków powinny być: zmniejszona emisja CO₂, zmniejszone zużycie energii i wody oraz ograniczenie tworzących się odpadów. Szczególną uwagę zwraca na wybór surowców do produkcji kosmetyków wskazując na ich źródła takie jak: produkty uboczne i odpady przemysłu spożywczego, które mogą być przetwarzane na surowce kosmetyczne w procesach biorafinacji mikroorganizmami oraz proekologiczne metody ekstrakcji np. płynami nadkrytycznymi, rozpuszczalnikami głęboko eutektycznymi. Tak prowadzone procesy ekstrakcyjne pozwalają pozyskiwać surowce zachowujące korzystne dla nich składniki: polifenole, witaminy, lignany, polisacharydy i inne substancje prozdrowotne, korzystnie działające na skórę.

Omawia szczegółowo kryteria wyboru surowców naturalnych i organicznych do produkcji kosmetyków o działaniu dermatologicznym, które są opublikowane przez międzynarodowe stowarzyszenie COSMOS. Interesujące jest to, że nie można pozyskiwać surowców kosmetycznych z roślin modyfikowanych genetycznie. Nie można również stosować surowców do produkcji kosmetyków uzyskanych w procesach biotransformacji prowadzonych z udziałem szczepów bakterii i grzybów modyfikowanych genetycznie. Istotną grupą surowców kosmetycznych uzyskiwanych na drodze biotransformacji z udziałem szczepów bakterii i drożdży są biosurfaktanty. Proces ich otrzymywania zużywa znacznie mniej wody i energii niż procesy syntezy konwencjonalnych surfaktantów.

W kolejnym rozdziale wstępu literaturowego Autorka omawia atopowe zapalenie skóry, jego objawy oraz przyczyny powstawania jako wynik zaburzeń immunologicznych. Efektem tych procesów jest zaburzenie prawidłowego funkcjonowania bariery naskórkowej, co w efekcie prowadzi do wzrostu ilościowego bakterii patogennych z rodzaju *Staphylococcus*, głównie *S. aureus*, wywołujących stany zapalne. Przy tej okazji prezentuje na rysunkach i szczegółowo omawia budowę skóry i naskórka oraz porównuje budowę skóry zdrowej i z atopowym zapaleniem.

Na zakończenie części wstępnej mgr Monika Krzyżostan dzieli się z czytelnikiem informacjami i wskazaniem dotyczącymi pielęgnacji skóry. Kluczową rolę w tym względzie odgrywa dbałość o utrzymywanie fizjologicznego pH (5,5) powierzchni skóry i odpowiedniej równowagi jej mikrobionu. Dlatego jest bardzo ważne stosowanie w higienie skóry produktów emolientowych, o charakterze lipofilowym i działaniu natłuszczającym, które nie podwyższają, tak jak mydło alkaliczne, pH skóry. Szczególnie polecanymi przez Autorkę kosmetykami są te, które obok lipidów zawierają również pochodzące z roślin saponiny i flawonoidy o działaniu przeciwzapalnym. W podsumowaniu mgr Monika Krzyżostan radzi

używać do mycia produkty zawierające surfaktanty niejonowe pochodzące np. z biofermentacji oraz naturalne emolienty.

Ostatnia część wstępu poświęcona jest azjatyckiej roślinie, wąkrocie azjatyckiej (*Centella asiatica* L.). Była ona od dawna (około 3 tys. lat temu) stosowana w Azji, w medycynie ajurwedyjskiej. Obecnie jest stosowana w tym regionie świata do leczenia chorób skóry: ran, blizn, oparzeń, trądu, trądzika, twardziny skórnej, bielactwa itd. Jest również stosowana w leczeniu chorób układu nerwowego, zaburzeń snu, depresji, choroby Alzheimera oraz zaburzeń endokrynologicznych, trawiennych i naczyniowo-sercowych. Nic dziwnego, że roślina ta znalazła się w centrum zainteresowań badaczy z pogranicza chemii i medycyny. Analiza chemiczna i badanie aktywności biologicznej wskazały, że za tą aktywność odpowiedzialne są glikozydy dwóch policyklicznych triterpenów, pochodnych ursanu: madekasozydu i azjatykozydu. Te czyste substancje wykazują również szerokie spektrum aktywności biologicznej: przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwwirusowe, neuroprotekcyjne i hepatoprotekcyjne. Oczywiście związki te jak i kwas madekasowy i azjatkowy są również środkami terapeutycznymi w leczeniu atopowego zapalenia skóry. Najczęściej stosowanymi surowcami z wąkroty azjatyckiej do produkcji kosmetyków o działaniu leczniczym są ekstrakty z liści tej rośliny otrzymywane w procesie ekstrakcji rozpuszczalnikami naturalnymi np. etanolem pochodzenia roślinnego. Drugim surowcem z wąkroty azjatyckiej jest bioferment z liści, który otrzymuje się z fermentacji rośliny z zastosowaniem *Lactobacillus reuteri*. Surowiec ten zawiera w swoim składzie obok połączeń aktywnych również metabolit mikroorganizmu reuterynę, która wykazuje także aktywność przeciwwgrzybiczą i przeciwzapalną.

Kolejną częścią opracowania jest prezentacja wyników badań własnych, które były zamieszczone w 3 oryginalnych pracach badawczych. W pierwszej pracy opublikowanej w *Molecules* zamieszczone są wyniki natury analitycznej. Oznaczano metodami chromatografii cieczowej zawartość substancji aktywnych: madekasozydu i azjatykozydu w surowcach używanych do formułacji kosmetyków oraz ich zawartość na stosowanych nośnikach: emulsjach i żelu oraz w procesie ich uwalniania z tych nośników. W pracy tej mgr Krzysztośan opisuje także metody preparowania trzech podłoży kosmetycznych (nośników). Wszystkie podłoża preparowano w procesach mieszania wcześniej przygotowanych składników w temperaturze pokojowej. Oznaczano ich stabilność oraz parametry fizykochemiczne takie jak: pH, lepkość, gęstość i potencjał zeta. Stabilność emulsji badano w przedziale czasowym 0-84 dni przechowywania w temp. 45°C. Mierzono również rozkład wielkości cząsteczek za pomocą technik dyfrakcji laserowej oraz elektroforetycznego rozproszenia światła i statycznego

wielokrotnego rozproszenia światła. Wyniki badań stabilności nośników wykazały, że najbardziej stabilnym układem jest emulsja olej/woda, a najmniej stabilny jest układ woda/olej. Badania układu żelu wskazują na niewielką agregację cząstek fazy rozproszonej. Pomiary pH w badanych nośnikach mieściły się w granicach od 4,93 (żel) do 5,45 (emulsja o/w). Dodanie ekstraktu (10%) z wąkroty azjatyckiej spowodowało nieznaczne obniżenie pH. Bardzo ważnymi badaniami w aspekcie zastosowania planowanych kosmetyków w praktyce były badania stabilności substancji aktywnych w nośnikach oraz kinetyka ich uwalniania. Badania stabilności dostarczyły bardzo dobrych wyników, gdyż stężenia substancji aktywnych madekasozydu i azjatykozydu we wszystkich trzech formułacjach po podgrzewaniu w temperaturze 45°C przez 2 miesiące wskazały takie samo stężenie jak w kosmetykach wyjściowych. Testy uwalniania aktywnych glikozydów z badanych nośników do płynów akceptorowych o pH 5,7 i 7,4 wykazały, że uwalnianie substancji aktywnych w ciągu 24h najbardziej efektywnie ma miejsce z nośnika o/w oraz z żelu. Warto zaznaczyć, że bardziej efektywnie glikozydy były uwalniane do roztworu o pH 7,4 niż do roztworu o pH 5,7.

Druga część omawiania wyników badań własnych przynosi informacje na temat testów *in-vivo* przygotowanych przez mgr Krzysztośan formułacji kosmetycznych na skórę z atopowym zapaleniem. Jest to więc test istotny dla praktycznego zastosowania otrzymanych preparatów. Badaniom zostały poddane trzy kosmetyki: balsam do ciała w postaci emulsji woda w oleju, krem do rąk również jako emulsja woda w oleju oraz krem do twarzy jako emulsja olej w wodzie. Do przygotowanych podłoży dodawano ekstrakt z liści wąkroty azjatyckiej w ilości 5% wagowych oraz bioferment w ilości 7% wagowych. Wersja kontrolna kosmetyków nie zawierała surowców pozyskiwanych z wąkroty azjatyckiej. Badania przeprowadzono na 20 osobach w wieku 21-54 lat posiadających nawracające swędzące zmiany o charakterystycznym rozmieszczeniu na skórze, jednak przy braku leczenia farmakologicznego podczas trwania testów i braku innych chorób skóry. Uczestnicy badań byli zobowiązani do stosowania produktów 2 razy dziennie przez okres 30 dni. Grupa uczestników badań została podzielona na dwie podgrupy: badaną, która otrzymywała kosmetyki z ekstraktem i biofermentem z wąkroty azjatyckiej i kontrolną, która otrzymywała kosmetyki bez tych surowców roślinnych. Ocenie poddawano następujące parametry skóry: przeznaskórkową utratę wody, nawilżenie warstwy rogowej naskórka, wygładzenie powierzchni skóry, szorstkość skóry i stopień złuszczenia naskórka. Badania przeznaskórkowej utraty wody wykazały, że produkty kosmetyczne zawierające surowce wąkroty azjatyckiej i produkty kontrolne w równie skuteczny sposób zapobiegają utracie wody przez naskórek. Na tej podstawie Autorka badań wyprowadza wniosek, że to emolienty zawarte w obu produktach badanych i kontrolnym wspierają

odbudowę naskórka i zapobiegają nawrotowi stanów zapalnych skóry. Badania poziomu nawilżania naskórka wykazały znaczny wpływ ekstraktu i biofermentu z wąkroty azjatyckiej na znaczną poprawę nawilżania warstwy rogowej naskórka na skórze tułowia (balsam do ciała) oraz dłoni (krem do rąk). Nie obserwowano takiego efektu przy stosowaniu kremu do twarzy. Autorka komentując ten wynik zwraca uwagę, że może to być wpływ rodzaju emulsji woda w oleju, która była zastosowana jako nośnik zarówno w balsamie jak i w kremie do rąk. W badaniach topografii skóry, tzn. badania wpływu ekstraktu i biofermentu na gładkość lub szorstkość oraz stopień złuszczenia naskórka obserwowano wzrost gładkości skóry pod wpływem kosmetyków z ekstraktem i biofermentem oraz obniżenie szorstkości skóry atopowej. Kosmetyki te zmniejszały także skutecznie złuszczenie naskórka.

Ostatni fragment prezentacji badań objętych tematem pracy doktorskiej to omówienie dalszych testów *in-vivo* wpływu kosmetyków na pH skóry, na rumień i na mikrobion skóry. Wyniki z tej części badań nie były dotąd publikowane. Badania wykazały, że kosmetyki z surowcami z wąkroty azjatyckiej obniżały pH skóry. Autorka wskazuje, że jest to wynik działania przeciwzapalnych składników ekstraktu i biofermentu, które zakwaszają skórę. Badania działania kremu do rąk z ekstraktem i biofermentem w większym stopniu niż kontrolne redukują intensywność rumienia. Stosowanie balsamu do ciała z ekstraktem i biofermentem z wąkroty zwiększało znacznie (o 38%) liczbę mikroorganizmów w mikrobionie badanego obszaru ciała. Analiza jakościowa tego mikrobionu wskazała na eliminację lub ograniczenie wzrostu takich szczepów chorobotwórczych jak *Staphylococcus spp.*, *Pantoea spp.*, *Bacillus spp.*

Na zakończenie prezentacji nieopublikowanych wyników przeprowadzonych badań przedstawia procedury wytwarzania dwóch kolejnych dermokosmetyków z ekstraktem (5%) i biofermentem (7%) z wąkroty azjatyckiej: emulsji do mycia ciała typu olej w wodzie i olejku do demakijażu z dodatkiem tylko ekstraktu (12%). Badania *in-vivo* przeprowadzono na grupie 10 ochotników posiadających skórę wrażliwą i atopową, którzy przez 2 tygodnie 2 razy dziennie stosowali te kosmetyki. Analizując wyniki badań poziomu przeznaskórkowej utraty wody, poziomu nawilżania naskórka, badań pH powierzchni skóry i poziomu rumienia Autorka stwierdziła, że stosowanie tych kosmetyków, podobnie jak poprzednio badanych wpływa korzystnie na skórę wrażliwą i atopową. Dla mnie byłoby interesujące bezpośrednie porównanie działania na skórę dwóch emulsji do mycia, typu woda w oleju i olej w wodzie.

Oceniając przeprowadzone przez mgr Monikę Krzyżostan badania i ich wyniki zaprezentowane w pracy doktorskiej chciałbym podkreślić, że w mojej opinii zostały przeprowadzone metodycznie bez zarzutu i profesjonalnie. Trudno się temu dziwić, bo były

wykonane w laboratorium o dużym doświadczeniu w tej tematyce badawczej i dużym doświadczeniu doktorantki w opracowywaniu receptur kosmetyków pielęgnacyjnych. Wstępne badania dermatologiczne przeprowadzono pod nadzorem dermatologa.

Oceniając uzyskane wyniki przeprowadzonych badań stwierdzam, że mają one dużą wartość naukową nie tylko o charakterze poznawczym, ale również, jak przystało na pracę doktorską wdrożeniową pod względem ich aplikacyjności w przemyśle kosmetycznym. O wartościach naukowych wyników świadczą tytuły czasopism, w których zostały opublikowane trzy oryginalne prace twórcze. Myślę, że wyniki nie opublikowane znajdują również miejsce w czasopismach o ustalonym *IF*. Uzyskane w badaniach wyniki były również prezentowane w wystąpieniach ustnych (5) i na posterach (7) na międzynarodowych (5) i krajowych (7) konferencjach naukowych. Dorobek naukowy mgr Krzyszostan uzupełniają dwa artykuły przeglądowe również w recenzowanych czasopismach o określonym *IF* oraz 7 artykułów w polskich czasopismach branżowych. O aplikacyjności badanych formułacji kosmetycznych z zawartością ekstraktu i biofermentu z wąkroty azjatyckiej o działaniu dermatologicznym świadczą wyniki badań ich wpływu na skórę wrażliwą lub dotkniętą atopowym zapaleniem. W mojej opinii największe szanse na wdrożenie mają emulsja do mycia olej w wodzie i krem do rąk.

Oceniając opracowanie wyników w postaci dysertacji stwierdzam, że ma ona przejrzysty układ i napisana jest dobrym stylem i językiem. Z dostrzeżonych niedociągnięć wymienię dwa: „modele mysie” i „ciężkość choroby”. Lepiej pisać o testach na myszach i zaawansowaniu lub ciężkim przebiegu choroby.

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Monika Krzyszostan zrealizowała cele pracy doktorskiej i uzyskała wartościowe naukowo wyniki, które mogą być przedmiotem wdrożenia w przemyśle kosmetycznym. Opracowanie tych wyników w załączonych publikacjach i ich prezentacja w dysertacji jest na dobrym poziomie. W konsekwencji stwierdzam, że praca doktorska mgr Moniki Krzyszostan pt. „Opracowanie nowej linii dermokosmetyków naturalnych i biodegradowalnych zgodnych z zasadami zrównoważonego rozwoju oraz wymaganiami Ecocert/COSMOS, przyjaznych środowisku i skórze” spełnia wymogi stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce i proszę Radę Naukową Dyscypliny Naukowej Chemia Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Proponuję również nagrodzić mgr Monikę Krzyszostan stosowną nagrodą.

